

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie



Alexandra Satrapová

Nosema bombycis jako modelový organismus pro studium polární trubice

Nosema bombycis as a model organism for polar tube study

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Markéta Petruš

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2018

.....

Alexandra Satrapová

Poděkování:

Děkuji své školitelce Mgr. Markétě Petřů za poskytnuté rady a pomoc při vypracování bakalářské práce.

Abstrakt: Mikrosporidie jsou skupinou obligátních intracelulárních parazitů s unikátním invazním mechanismem. Jednou z vysoce specializovaných invazních struktur je polární trubice, která je příkladem biologické nanotrubice, jejíž studium by mohlo přinést poznatky využitelné v biotechnologiích. Práce je literárním přehledem, který se zabývá stavbou spory mikrosporidií a představuje *N. bombycis* jako vhodného zástupce pro studium infekčního aparátu. Detailněji shrnuje dosavadní poznatky o stavbě polární trubice a stěny spory *N. bombycis*.

Klíčová slova: *Nosema bombycis*, *Bombyx mori*, polární trubice, PTP, SWP

Abstract: Microsporidia is a group of obligatory intracellular parasites with a unique invasion mechanism. One of the highly specialized invasion structures is the polar tube which is an example of a biological nanotube the study of which could bring usable knowledge in biotechnology. The thesis is a literary overview which deals with the structure of microsporidian spores and presents *N. bombycis* as a suitable representative for the study of the infectious apparatus. In more detail, it summarizes the background to the structure of the polar tube and wall of *N. bombycis* spore.

Key words: *Nosema bombycis*, *Bombyx mori*, polar tube, PTP, SWP

Obsah

1. Úvod	1
2. Mikrosporidie	2
2.1 Systematické zařazení	2
3. Životní cyklus	4
3.1 Vegetativní stádium	4
3.2 Spora	6
3.2.1 Stavba spory	6
3.2.2 Aktivace spory	7
3.3 Infekce	7
4. Kultivace <i>Nosema bombycis</i> v laboratoři	10
5. Stavba invazního aparátu <i>N. bombycis</i>	12
5.1 Stěna spory	12
5.1.1 Stavba stěny	12
5.1.2 SWP	13
5.2 Polární trubice	18
5.2.1 Proteiny polární trubice	18
5.3 Interakce mezi SWP a PTP	18
6. Závěr	20
7. Seznam zkratk	21
8. Citovaná literatura	22

1. Úvod

Mikrosporidie jsou jednobuněční obligátní parazité. Mezi typické hostitele mikrosporidií patří hmyz nebo ryby; k infekci však dochází u mnoha dalších živočichů napříč obratlovci i bezobratlými (Han & Weiss, 2017). Výjimkou není ani člověk, u kterého jsou infekcí ohroženi především imunosuprimovaní jedinci (Brown et al., 2018).

Mikrosporidie se vyskytují ve dvou morfologicky odlišných formách. Redukované vegetativní stádium se nachází v hostiteli, stádium spory je přizpůsobené k přežití ve vnějším prostředí a k infekci dalšího hostitele. Pro účely infekce se u mikrosporidií vyvinul unikátní invazní aparát, který se skládá ze struktur uložených v cytoplasmě – kotevního disku, polární trubice, polaroplastu a posteriorní vakuoly (Yang et al., 2018).

Polární trubice slouží k přenesení infekční sporoplasmy do hostitele. Jedná se o dutou nanotrubici, která nemá v biologické sféře obdoby. Pokud by se zjistilo přesné složení a mechanismus skládání by bylo možné reprodukovat *in vitro*, polární trubice by jistě našla široké uplatnění v nanotechnologiích. Příkladem by mohl být transport léků přímo do buněk, čímž by se zvýšila efektivita léčby některých onemocnění a snížilo by se poškození okolních zdravých tkání.

Ačkoli je podoba spory již dlouho známa a částečně byl objasněn i způsob přenesení sporoplasmy do hostitele, formování struktur invazního aparátu či jeho přesné molekulární složení není známo.

Tato práce představuje sporu mikrosporidií a dává si za cíl shrnout dosavadní poznatky o její stavbě s důrazem na stěnu spory a polární trubici. Jako vhodný zástupce pro studium speciálního infekčního aparátu je v této práci představena *Nosema bombycis*. Byla vybrána především pro její pozitivní vlastnosti týkající se kultivace v laboratoři a jejímu významu v produkci hedvábí tradiční cestou.

2. Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou obligátně intracelulární parazité všech skupin živočichů a některých protist; popsáno je již zhruba 1400 druhů v 200 rodech (Han & Weiss, 2017). Jedná se o jednobuněčná eukaryota tvořící odolné spory, díky nimž přežívají ve vnějším prostředí a jsou schopni infikovat dalšího hostitele. Do povědomí se primárně dostaly v souvislosti s nákazou larválních stádií bource morušového (*Bombyx mori*), čímž působí ekonomické škody na farmách s produkcí hedvábí. Tato nemoc se nazývá pebrina a je způsobena mikrosporidií *Nosema bombycis*, v roce 1857 první popsanou mikrosporidií. Dalšími častými hospodářsky významnými hostiteli mikrosporidií jsou například ryby, krevety, či další hmyz (Yang et al., 2018). Tyto nákazy nepředstavují přímé ohrožení člověka kromě ekonomických ztrát, dokonce se využívají k prospěchu člověka v biologickém boji (Reynolds, 2013). Jsou však i případy, kdy mikrosporidie napadají člověka. S nákazou člověka se nejčastěji spojuje *Enterocytozoon bieneusi*. Ohroženi jsou zvláště imunosuprimovaní jedinci (pacienti s HIV/AIDS, osoby po transplantacích orgánů), u nichž může způsobovat systémové infekce (Brown et al., 2018).

2.1 Systematické zařazení

Zařazení mikrosporidií do systému nebylo zcela jednoduché a dodnes není definitivně upřesněné. Mikrosporidie vykazují odvozené znaky, jako je přítomnost redukované mitochondrie postrádající DNA, tzv. mitosomu, absence peroxisomů a klasického Golgi aparátu složeného z cisteren a přítomnost 70S ribosomů. Jejich jaderný genom je extrémně redukován (*Encephalitozoon cuniculi* má genom o velikosti pouze 2,9 Mb) (Keeling & Fast, 2002). Před objevem mitosomu se proto předpokládalo, že se jejich vývojová větev oddělila od ostatních eukaryot ještě před vznikem mitochondrií a byly zařazeny spolu s dalšími protisty do bazální skupiny eukaryot, Archezoí (Vossbrinck et al., 1987). Pozdější studie založené na analýze tubulinu či Hsp70 však naznačily příslušnost k Fungi (Hirt et al., 1999). Na základě

molekulárních studií dnes víme, že mikrosporidie nejsou velice stará primitivní skupina, naopak se jedná o pokročilá eukaryota, která jsou zredukováná extrémním parazitismem a mají společného předka se skupinou Fungi. Není ale zatím jisté, zda se jedná o bazální nebo sesterskou linii Fungi (Lee et al., 2008).

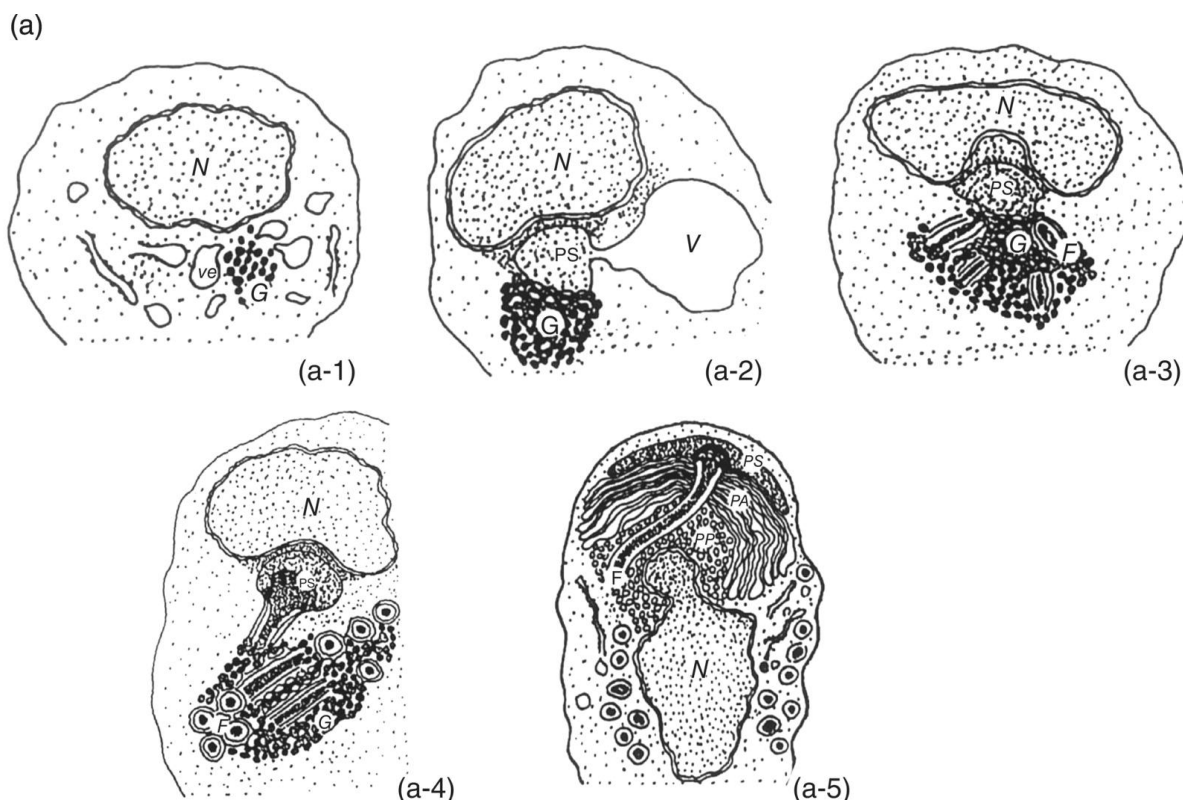
3. Životní cyklus

U mikrosporidií rozlišujeme vegetativní stádium, které slouží k namnožení parazita uvnitř hostitele, a stádium spory, které se vyskytuje ve vnějším prostředí a slouží k infekci dalšího hostitele.

3.1 Vegetativní stádium

V průběhu vegetativního stádia rozlišujeme tři fáze. 1, Merogonie, neboli proliferační fáze, kdy se parazit v hostiteli množí. Zmnožování merontů je pro různé rody mikrosporidií variabilní. Některé mikrosporidie se dělí ihned po rozdělení jádra klasickým binárním dělením, zatímco u jiných je buněčné dělení opožděné a následuje až po vzniku mnohояderného útvaru. Dělení se mohou i několikrát opakovat, čímž se zvyšuje efektivita infekce. 2, Sporogonie. V určité fázi infekce stěna merontů tloustne a začínají se formovat sporonti, kteří se dělí za vzniku sporoblastů. 3, Finální fází je dozrávání sporoblastů ve spory, při kterém se vytváří sporová stěna a infekční aparát (Han & Weiss, 2017).

Pomocí elektronové mikroskopie bylo pozorováno, že formování jednotlivých částí infekčního aparátu začíná tvorbou vakuoly, ze které je odvozen polaroplast, a elektrondenzních váčků. Tyto váčky jsou nejspíše odvozeny od Golgi aparátu. Toto pozorování podporuje přítomnost signálních sekvencí pro průchod sekretorickou drahou v genech kódujících proteiny infekčního aparátu, které tak mohou být pomocí váčků transportovány na místo, kde jejich fúzí vznikají smyčky polární trubice (Takvorian & Cali, 1996). Schematický náčrt formování infekčního aparátu je znázorněn na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Nákres vývoje infekčního aparátu: (a-1) Váčky odvozené od Golgi aparátu (G) se nejdříve seskupí v blízkosti jádra (N), kde poté (a-2) obklopí vznikající polární vak (PS) odvozený od vakuoly (V). (a-3) Fúzí váčků začínají vznikat smyčky polární trubice (F). (a-4) Polární vak a smyčky polární trubice se začínají organizovat. (a-5) Polární vak je transportován do anteriorní části budoucí spory a tvoří se lamelární (PA) a váčkový (PP) polaroplast (Wittner & Weiss, 1999).

Schopnost vícečetného dělení umožňuje vyplnění celého obsahu hostitelské buňky zralými sporami. Infekční stádia mikrosporidií jsou následně uvolněna za současné destrukce hostitelské buňky.

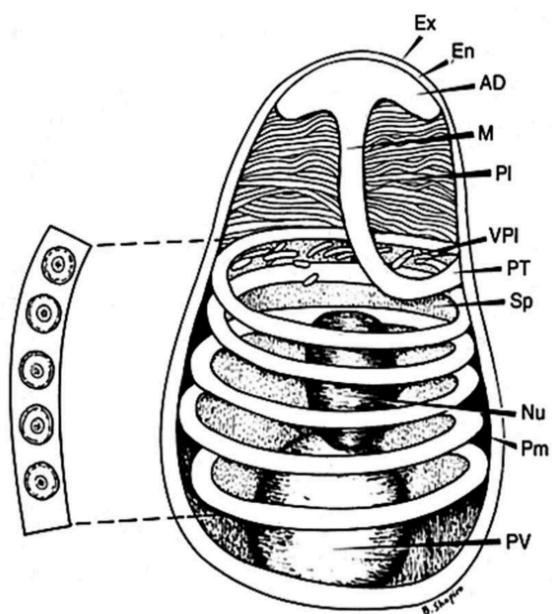
Variabilitu pozorujeme jak v morfologii a způsobu dělení merontů a sporoblastů, tak v lokalizaci stádií v hostitelské buňce. Dělení často probíhá přímo v cytoplasmě, ale v některých případech se tvoří parazitoformní vakuola hostitelského původu (Han & Weiss, 2017).

3.2 Spora

3.2.1 Stavba spory

Spora je jednobuněčný útvar, většinou oválného tvaru. Dvouvrstvá stěna chrání sporu v prostředí mimo hostitele. Spora obsahuje buněčnou cytoplasmu, tzv. sporoplasmu, a buněčné jádro. V některých případech, např. u *N. bombycis*, mohou být jádra dvě. Součástí sporoplasmy jsou pro eukaryota typické struktury, jako jsou endoplasmatické retikulum a Golgi aparát. Dále obsahuje také mitosomy a pro mikrosporidie specifické struktury infekčního aparátu: kotevní disk, polární trubici, polaroplast a posteriorní vakuolu, která v některých případech vyplňuje až polovinu buňky. Polaroplast je systém váčků a cisteren, který je umístěn v anteriorní části a vyplňuje třetinu až polovinu objemu spory; rozděluje se na váčkový a lamelární. Lamelární je více uspořádaný a vyskytuje se na anteriorní straně, zatímco váčkový se nachází posteriorně. Na anteriorní straně spory je stěna zřetelně ztenčená. V tomto místě je lokalizovaný přichycovací disk, který upevňuje polární trubici. Anteriorní část trubice, tzv. manubrium, je rovný úsek, na který navazují spirálovité smyčky trubice, které vedou skrz sporu až k posteriorní vakuole, přičemž počet závitů je typický pro jednotlivé druhy (Yang et al., 2018). Nákres spory je na obrázku č. 2.

Obrázek č. 2: Schématický nákres spory. Ex – exospora, En – endospora, Pm – plasmatická membrána, Sp – sporoplasma, Nu – jádro, PV – posteriorní vakuola, AD – přichycovací disk, M – manubrium, PT – polární trubice (posteriorní část stočená do smyček), PI – lamelární polaroplast, VPI – váčkový polaroplast (Wittner & Weiss, 1999).



3.2.2 Aktivace spory

Spory mikrosporidií přežívají ve vnějším prostředí i několik let v dormantním stavu (Vávra & Larsson, 1999; Yang et al., 2018). Spora se aktivuje na základě signálů z prostředí. Za hlavní stimulanty se považuje tlak, stav hydratace či pH. Velký vliv má také přítomnost určitých solí nebo trávicích enzymů, které se nacházejí ve vnitřním prostředí hostitele. Platí však, že spory různých zástupců mají odlišnou citlivost. V laboratorních podmínkách se často používá víceukroková stimulace – nejdříve se spory vystaví alkalickému prostředí, které se posléze neutralizuje přidáním solí (Undeen, 1990). Například spory *N. bombycis* se aktivují působením 0,1 M KOH při 25 °C po dobu 30 min a poté 0,25 M KH₂PO₄ také 30 min (Wang et al., 2007).

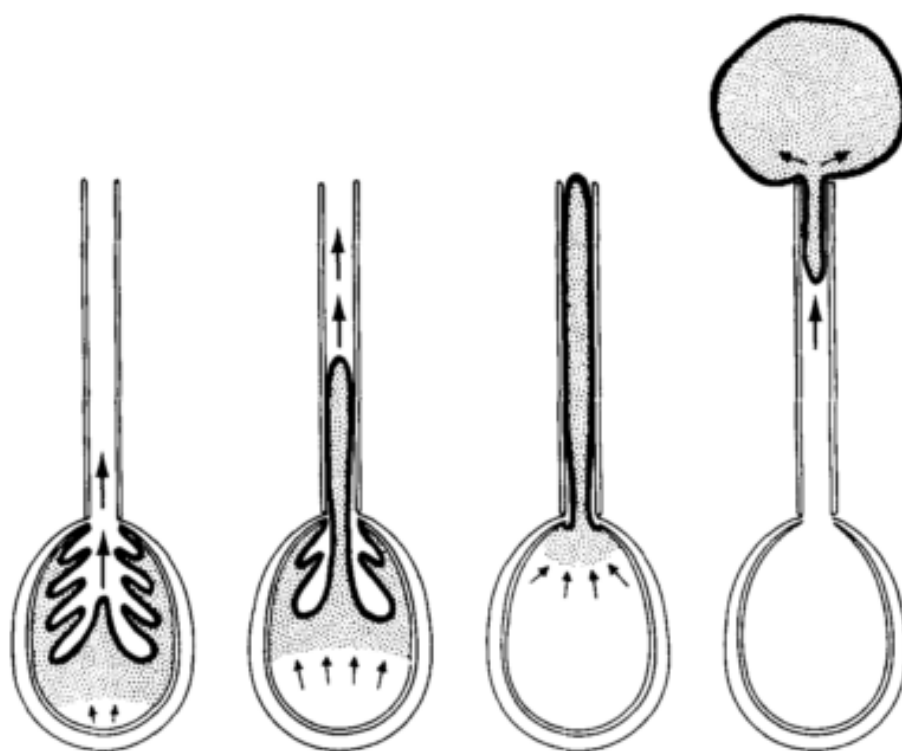
3.3 Infekce

K nakažení hostitele nejčastěji dochází pozřením či vdechnutím spory, po kterém následuje velice rychlé „vystřelení“ polární trubice, které trvá pouhé 2 s, a přenos sporoplasmy do cytoplasmy hostitele.

Vnější stimul způsobí kaskádu reakcí, která vede buď k aktivaci trehalázy nebo k odstranění kompartmentace mezi trehalózou a trehalázou. Výsledkem je štěpení trehalózy (popřípadě jiného analogického substrátu), čímž se generuje velká koncentrace menších molekul a zvyšuje se osmotický tlak. Osmotickým pohybem se pak dovnitř dostává voda a dochází k „otoku“ buňky (Undeen, 1990). Spora v anteriorním ztenčení pukne a polární trubice se dostává do vnějšího prostředí tak, že se jako prst rukavice otočí naruby (Keohane & Weiss, 1998; Lom & Vávra, 1963). Posteriovní vakuola se dále zvětšuje přijímáním vody a vytlačuje sporoplasmu do polární trubice, která je mimo sporu mnohonásobně delší než spora samotná. Podle studie (Weidner, 1972) je „nevystřelená“ trubice 20-30x delší než spora a po „vystřelení“ je 100-120x delší. Nepoměr délky trubice uvnitř a vně spory není dodnes objasněn. Existují dvě hypotézy: 1, Polární trubice uvnitř buňky je pouze materiál, který se až při vystřelení začíná skládat a trubice roste. Tato hypotéza je málo

pravděpodobná vzhledem ke krátké době „vystřelení“. 2, Formování polární trubice je dokončeno již uvnitř spory a nepoměr délek mezi „nevystřelenou“ a „vystřelenou“ trubicí spočívá pouze v tom, že je trubice vysoce kontraktilní.

Sporoplasma je po pasáži polární trubicí obalena plasmatickou membránou, přestože původní plasmatická membrána zůstává uvnitř vyprázdněných sporových obalů. Nová plasmatická membrána má tedy jiný původ. Pochází pravděpodobně z polaroplastu (Weidner et al., 1984). Mechanismus obalení sporoplasmy membránou z polaroplastu je zobrazen na obrázku č. 3.

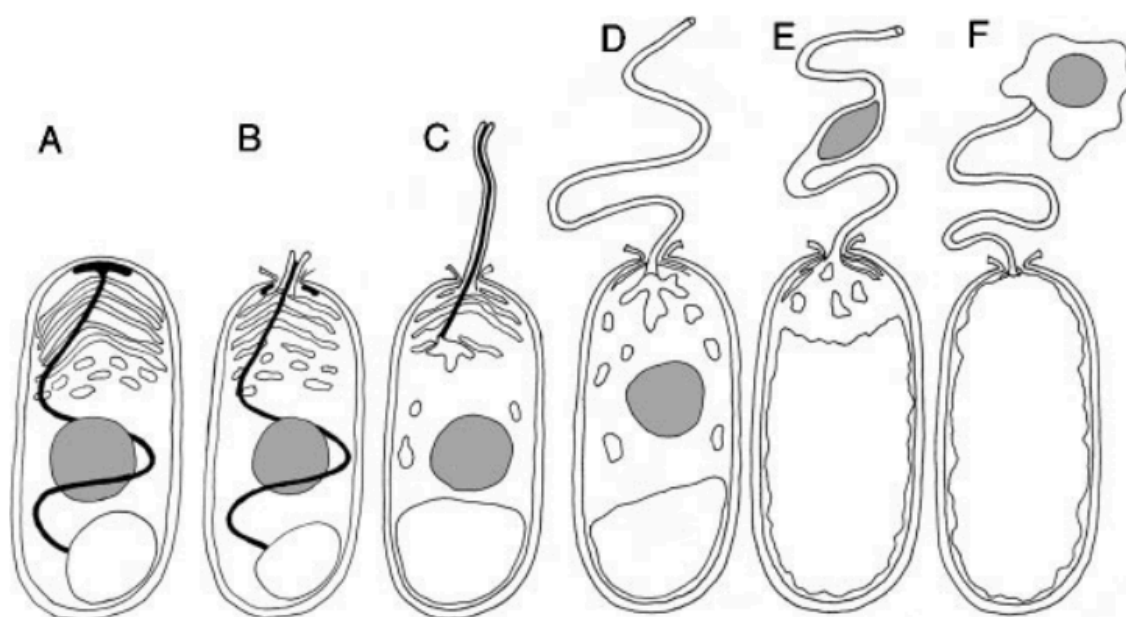


Obrázek č. 3: Mechanismus obalení sporoplasmy plasmatickou membránou při pasáži polární trubicí. Původní plasmatická membrána zůstává ve sporových obalech a nová se vytváří z polaroplastu (Weidner et al., 1984).

Pro samotnou pasáž sporoplasmy přes membránu hostitelské buňky existují 3 hypotézy. 1, Polární trubice penetruje hostitelskou buňku a sporoplasma se dostává přímo do cytoplasmy hostitelské buňky. 2, Spora se naváže na receptory hostitelské buňky a je fagocytována. Poté dojde k extruzi polární trubic a penetraci fagolysosomu a sporoplasma se opět dostává do cytoplasmy hostitele (Franzen et al., 2004).

3, Vystřelení polární trubice velkou rychlostí nezpůsobí penetraci hostitelské buňky ale vytvoření invaginace na povrchu hostitelské buňky, která je podle (Han et al., 2017) u *E. hellem* iniciována interakcí proteinu PTP4 a transferinového receptoru hostitelské buňky. Sporoplasma se dostává dovnitř vytvořeného tunelu, kde interaguje s hostitelskou membránou. Interakce způsobí vytvoření parazitoformní vakuoly z hostitelské membrány a sporoplasma se dostává dovnitř buňky. Celý životní cyklus proběhne uvnitř parazitoformní vakuoly, která slouží jako ochrana proti rozeznání parazita. Tento způsob byl pozorován u zástupců rodu *Encephalitozoon* (Bohne et al., 2011).

Nákres mechanismu „vystřelení“ polární trubice a vytlačování sporoplasmy je na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Schématické zobrazení procesu „vystřelení“ polární trubice. A – spora v klidovém stavu, B – puknutí anteriorní ztenčené části spory. C – provlékání trubice (jako prst rukavice), D – „vystřelená“ trubice, E – sporoplasma procházející trubicí, F – sporoplasma po pasáži polární trubicí (Keeling & Fast, 2002).

4. Kultivace *Nosema bombycis* v laboratoři

N. bombycis se v laboratoři kultivuje na larvách bource morušového (*B. mori*), anebo na buněčné kultuře připravené z hmyzích buněk, která byla využita již v roce 1969 pro pozorování životního cyklu *N. bombycis* (Ishihara, 1969). Často používanou buněčnou linií jsou BmN buňky původem z vaječníků *B. mori* (Pan et al., 2010) a BmE buňky z embryonální tkáně *B. mori* (Pan et al., 2007).

Bourec morušový je přirozeným hostitelem *N. bombycis*, který je domestikovaný. Jedná se o zástupce holometabolního hmyzu s nepřímým vývojem a dokonalou přeměnou. Po vylíhnutí z vajíčka prochází 5 larválními stádii. Larvy přijímají potravu a rostou. Přejít mezi instary je doprovázen svlékáním kutikuly. U 5. instaru dojde k zakuklení pomocí hedvábných vláken, které jsou produkovány snovacími žlázami larvy. Z kukly se líhne dospělý jedinec, jehož jediným úkolem je reprodukce; nepřijímá tedy potravu ani neroste. Výsledkem jsou oplozená vajíčka o velikosti špendlíkové hlavičky (Zhou et al., 2015).

Nejnáročnějšími požadavky při chovu bource morušového jsou teplota a vlhkost, které jsou specifické pro jednotlivá vývojová stadia. Infekce se provede přidáním spor *N. bombycis* do drcených listů moruše, jimiž se larvy po vylíhnutí z vajíček živí.

Infekce, ke které může dojít i transovariálním přenosem ze samičky na potomky, se projevuje chronickým poškozením larev. Postihuje buňky střeva, snovacích žláz, svalů a Malpighických trubic a způsobuje nízkou aktivitu larev a pomalý vývoj. Typickým znakem nemoci zvané pebrina jsou také černé fleky (Pan et al., 2013 podle Pasteur, 1870). Rozdíl mezi zdravými a nakaženými larvami je dobře viditelný na obrázku č. 5.



Obrázek č.5: Larvy *B. mori*. A – Zdravá larva, B – Larva nakažená *N. Bombycis* (Liu et al., 2016).

Snadná kultivace v laboratoři je hlavním faktorem pro výběr *N. bombycis* jako vhodného modelového organismu pro výzkum polární trubice. Veškeré vybavení pro kultivaci bource morušového, jako například plastové boxy, Petriho misky, kleště a mřížky pro manipulaci, se dají objednat společně s vajíčky *B. mori* a sušenou drtí listů moruše na internetu. Hotové sety jsou dostupné například na <http://www.silkwormstore.co.uk>. Na obrázku č. 6 jsou larvy bource morušového chované v laboratoři.



Obrázek č. 6: Larvy bource morušového (*Bombyx mori*) krmené drtí listů moruše na Petriho misce. (Foto: M. Petrů)

5. Stavba invazního aparátu *N. bombycis*

Jak bylo popsáno v kapitole 3.2.1, invazní aparát mikrosporidií se skládá z kotevního disku, polární trubice, polaroplastu a posteriorní vakuoly. Pro správnou funkci invazního aparátu je však nezbytná i stěna spory, u které bylo zjištěno, že její proteiny zprostředkovávají řadu důležitých interakcí s polární trubicí a hostitelskou buňkou. Pro účely této bakalářské práce bude detailnější popis stavby invazního aparátu omezen na polární trubicí a stěnu spory.

Přesná proteinová kompozice stěny spory a polární trubice stále není známa. Proteiny lokalizované ve stěně spory jsou označovány jako „Spore Wall Proteins“ (SWPs), proteiny polární trubice jsou označovány jako „Polar Tube Proteins“ (PTPs). Objev dalších nových SWPs a PTPs a studium jejich vzájemných interakcí je nezbytné pro pochopení stavby polární trubice.

U *N. bombycis* vychází identifikace proteinů často z podobnosti již objevených proteinů především u zástupců rodu *Encephalitozoon* (Yang et al., 2018).

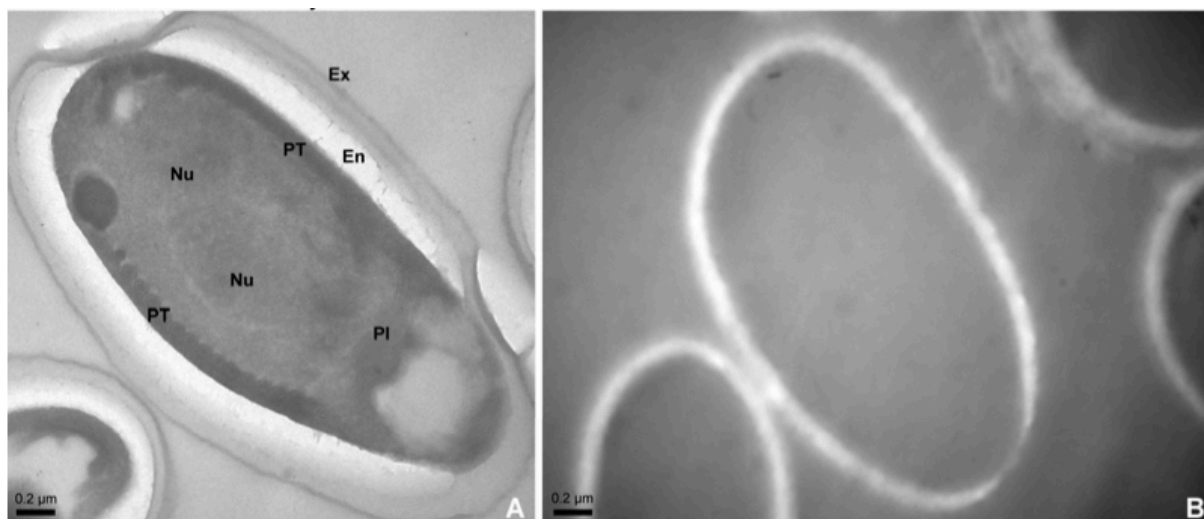
5.1 Stěna spory

5.1.1 Stavba stěny

Stěna spory neplní pouze ochrannou funkci. Podílí se také na přichycení polární trubice, signalizaci, adhezi k hostitelské buňce či enzymatické interakci. Její součástí je i přichycovací disk, který upevňuje polární trubicí. Skládá se ze tří vrstev, jimiž jsou plazmatická membrána, endospora a exospora (Yang et al., 2018). Vrstvy stěny jsou viditelné na obrázku č. 7-A.

Plazmatická membrána je uložena nejhluběji a přímo obaluje sporoplasmu. Nad ní je uložena endospora, 25-30 nm tlustá elektronlucentní vrstva složená z proteinů, ale především z chitinu. Samotná vrstva chitinu se nazývá DCSCs (deproteinované chitinové sporové obaly). Je tvořena sítí složenou z fibril, zaručující pevnost a v laboratorních podmínkách se izoluje povařením spor v 1 M NaOH. Takto izolovaná vrstva (obr. č. 7-B) nabyde větší tloušťky a je volnější než u neošetřených

spor (obr. č. 7-A), což dokazuje, že proteiny fungují jako lešení a určují stavbu stěny. Vnější vrstvu tvoří 30-35 nm tlustá elektrondenzní exospora složená z proteinů (SWPs) (Yang et al., 2014).



Obrázek č. 7: A – Spora *N. bombycis* (Ex – exospora, En – endospore, PI – polaroplast, PT – polární trubice, Nu – jádro); B – Izolovaná vrstva DCSCs (Yang et al., 2018).

5.1.2 SWP

Pro identifikaci proteinů stěny spory *N. bombycis* se zatím využíval zejména jeden přístup, a to následující kombinace proteomických metod (Li et al., 2008; Wu et al., 2009). Buňky byly ošetřeny pro získání povrchových proteinů. Tyto proteiny byly rozděleny na proteinové elektroforéze (SDS-PAGE a 2-D gelové elektroforéza), a potom charakterizovány hmotnostní spektrometrií. Proti jednotlivým získaným proteinům byly vytvořeny protilátky, díky nimž mohly být proteiny ve spoře lokalizovány pomocí fluorescenční a elektronové mikroskopie. Byly také sledovány signální sekvence na N-koncích, které by potvrdily transport skrz sekretorickou dráhu na povrch buňky, místa pro glykosylaci a fosforylaci, či přítomnost heparin-vazebných motivů (HBM), které by mohly zprostředkovávat interakce s hostitelkou buňkou, např. adhezi.

Adheze k hostitelské buňce může předcházet „vystřelení“ polární trubice, a proto je považována za jeden ze stimulů pro její iniciaci. Glykosaminoglykany (GAG) na povrchu hostitelské buňky byly již dříve popsány jako důležité faktory pro úspěšnost infekce. Studie na *E. intestinalis* ukázala, že důležitou roli mají sulfonované proteoglykany, protože jejich zablokováním výrazně klesl počet adherovaných spor v porovnání s kontrolou. Vzhledem k současnému poklesu počtu infikovaných buněk se dá také spekulovat, že adheze může stimulovat „vystřelení“ polární trubice (Hayman et al., 2005). Heparin-vazebné motivy také mohou interagovat s hostitelskými GAG. HBM je definován jako úsek aminokyselin splňující vzorec „XBBXBX“, „XBBBXXBX“ nebo „XBBXBXBBX“, kde „X“ představuje neutrální aminokyselinu a „B“ pozitivně nabitou basickou aminokyselinu (Cardin & Weintraub, 1989).

SWP30, SWP32, SWP25

První práce experimentálně hledající SWPs u *N. bombycis* je studie (Wu et al., 2008). Bylo zde detekováno 14 hypotetických SWPs (HSWPs). U devíti z nich sekvenční analýza potvrdila přítomnost N-terminálního signálního peptidu s délkou od 17 do 22 aminokyselinových zbytků. U všech 14 HSWPs byla predikována místa pro glykosylaci a u 10 z nich heparin-vazebný motiv. Studie se dále detailněji zabývala třemi hlavními SWPs o velikostech 32,7 kDa (SWP32), 30,4 kDa (SWP30) a 25,3 kDa (SWP25). SWP30 byl identifikován jako endosporový, SWP32 jako exosporový. Navazující studie (Wu et al., 2009) charakterizovala SWP25 jako 269 aminokyselin dlouhý endosporový protein se signálním peptidem o 20 aminokyselinách a heparin-vazebným motivem „XBBXBX“ v oblasti 77-82. Predikovaná jsou místa pro fosforylaci a O-glykosylaci.

SWP26

Dalším proteinem lokalizovaným ve stěně spory *N. bombycis* je 224 aminokyselin dlouhý SWP26 o velikosti 25,7 kDa. Na N-konci je kódována 16 aminokyselin dlouhá signální sekvence. Ve velké koncentraci byl detekován ve vyvíjející se endospoře, což indikuje roli při sestavování endospory během zrání spor. Po sestavení stěny koncentrace SWP26 klesá, ale protein je nadále detekován i ve zralých sporách. Experimentálně bylo potvrzeno, že se HBM motiv na C-konci proteinu (XBBBXXBX v oblasti 207-214) podílí na adhezi k hostitelské buňce (Li et al., 2009). Toto pozorování podporuje i studie, která metodou dvouhybridního kvasinkového systému prokázala vazbu SWP26 na protein *BmTLP* (*Bombyx mori* Turtle-Like Protein), který se vyskytuje na buňkách *B. mori* (Zhu et al., 2013).

SWP5

V exospoře pouze zralých spor byl detekován protein dlouhý 186 aminokyselin o velikosti 20,3 kDa. Nese označení SWP5 a obsahuje 20 aminokyselin dlouhou signální sekvenci a 8 predikovaných míst pro O-glykosylaci. Na buněčné linii BmN bylo testováno, jak SWP5 ovlivňuje fagocytózu. Zralé spory byly výrazně méně fagocytovány než sporoblasty, u kterých SWP5 chybí. Předpokládá se tedy, že SWP5 blokuje receptory hostitelských buněk odpovědných v rozpoznání patogenních motivů na povrchu spory. Spekuluje se tedy, že zabezpečuje strukturní a ochrannou funkci (Cai et al., 2011). Blokace SWP5 vedla ke snížení „vystřelování“ trubice po alkalické stimulaci pomocí K_2CO_3 , což indikuje, že další možnou funkcí SWP5 je vnímání vnějších stimulů a umožnění „vystřelení“ trubice (Li et al., 2012).

SWP12

SWP12 je 228 aminokyselin dlouhý protein o velikosti 26,6 kDa. Na N-konci má predikovaný HBM ve vzoru XBBXBX v oblasti 33-38, N-glykosylační místo v úseku 117-120 a 16 fosforylačních míst. Srovnávací genomická analýza ukázala, že SWP12 má homology napříč mikrosporidii. Vysoká identita je zejména mezi homology

N. bombycis, *N. ceranae*, *E. cuniculi* a *E. bienersi*. Sekvence *N. bombycis* a *Nosema antheraeae* se dokonce liší pouze v 6 aminokyselinách. Díky konzervované sekvenci mají tyto homology zachovanou i sekundární strukturu. Skládají se ze 7 alfa-helixů; *E. cuniculi* a *E. intestinalis* obsahují navíc jeden beta-list. Rekombinantní protein SWP12 se váže na DCSCs upravené spory, což indikuje jeho podíl na formování stěny spory (Chen et al., 2013).

SWP7, SWP9

Dalšími popsány proteiny stěny spory jsou SWP7 a SWP9. SWP7 je 32,8 kDa velký protein s predikovaným signálním peptidem. SWP9 je protein složený z 367 aminokyselin o velikosti 42,8 kDa, který obsahuje N-koncovou transmembránovou doménu. U ostatních mikrosporidií byla nalezena řada homologů. Detailnější charakterizací se zjistilo, že lokalizace není omezena pouze na stěnu spory, ale liší se napříč vývojovými stádii. U sporontů se SWP7 i SWP9 nacházejí v cytoplasmě, přičemž SWP9 ve větším množství. U sporoblastů je SWP7 stále v cytoplasmě, zatímco SWP9 se přemísť do stěny spory. U zralých spor společně kolokalizují ve stěně spory, přičemž SWP9 je do stěny sekretován dříve než SWP7.

SWP9 se váže na DCSCs, což umožní navázání SWP7. SWP9 tedy může sloužit jako strukturní lešení pro navázání dalších proteinů a významně se tak účastní formování stěny. Přestože u SWP7 ani SWP9 nebyl nalezen HBM, účastní se tyto proteiny adheze k hostitelské buňce – jejich inhibice způsobila pokles adheze o 35 % a pokles úspěšnosti infekce o více jak 40 % (Yang et al., 2015).

SWP16

SWP16 je 44 kDa velký protein složený z 383 aminokyselin lokalizovaný v exospoře. Homologní proteiny identifikované v jiných mikrosporidiích jsou sekvenčně identické z 26-34 %. Byl zde predikován signální peptid o délce 25 aminokyselin na N-konci, dvě potenciálně glykosylovatelná místa a více jak 30 fosforylovatelných míst. SWP16 obsahuje také 3 HBM motivy, které se pravděpodobně podílejí na adhezi k hostitelské buňce. Blokací SWP16 klesla adheze k hostitelským buňkám o více jak 20 % v porovnání s negativní kontrolou (Wang et al., 2015).

EOB13320

EOB13320 se skládá z 1041 aminokyselin, které tvoří 117 kDa velký protein. Byl detekován ve více vývojových stádiích, merogonie a sporogonie. U merontů byl lokalizován ve velkém množství v cytoplasmě a postupným vývojem spory docházelo k postupné sekreci na povrch buňky. Tloušťnutí stěny sporoblastů bylo doprovázeno zvýšením koncentrace EOB13320 v oblasti endospory a snížením v cytoplasmě. Ve zralých sporách už v cytoplasmě nebyl detekován a koncentrace v endospoře mírně klesla. EOB13320 je tedy exprimován nejvíce v době formování endospory, což indikuje, že se jedná o klíčový protein při stavbě endospory (Li et al., 2015).

EOB14572

Protein z 316 aminokyselin o velikosti 37 kDa byl lokalizován jak v endospoře, tak polární trubici. Lokalizace v polární trubici je upřesněna v kapitole 5.3. Obsahuje N-koncovou transmembránovou doménu a 4 tandemové repetice bohaté na GC páry a hydrofilní zbytky. Stabilita DNA sekvencí pozitivně koreluje s obsahem GC párů, proto se spekuluje, že tyto tandemové úseky mají větší stabilitu než zbylé úseky genomu. Funkce tandemových úseků *N. bombycis* však zatím není známa (Wang et al., 2017).

5.2 Polární trubice

Dutá trubice dosud velmi málo známého složení je struktura, pomocí které se infekční sporoplasma dostává do hostitelské buňky. Rozlišují se dvě části, manubrium a distální část. Manubrium je pomocí kotvícího disku připojeno k vnitřní straně spory na její anteriorní části a směřuje přímo k posteriorní části buňky. Na manubrium navazuje zadní část trubice stočená do smyček, které jsou omotány kolem sporoplasmy (Xu & Weiss, 2005; Wittner & Weiss, 1999).

5.2.1 Proteiny polární trubice

Studie (Wang et al., 2007) charakterizovala obdobným způsobem, popsáním u SWPs, 3 potenciální proteiny polární trubice u *N. bombycis*, které dostaly označení PEL a mají následující vlastnosti: PEL1 (54 kDa, pI 5,4), PEL2 (36 kDa, pI 10), PEL3 (150 kDa, pI 7,1). Již dříve byly z poznatků o jiných mikrosporidiích charakterizovány rodiny PTP, které obsahují proteiny s podobnou velikostí a izoelektrickým bodem. Rodina PTP1 obsahovala proteiny o velikosti 50-55 kDa s izoelektrickým bodem v kyselé oblasti (4,4 – 5,5). PTP2 rodina zahrnovala 35 kDa velké basické proteiny, zatímco rodina PTP3 se skládala z 150 kDa velkých mírně kyselých proteinů. Na základě srovnání s těmito rodinami byly proteiny PEL1, PEL2 a PEL3 přejmenovány na PTP1, respektive PTP2 a PTP3.

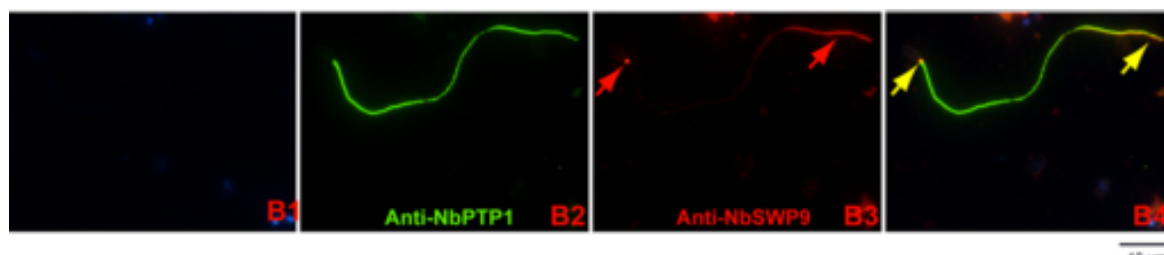
Další dva proteiny polární trubice byly popsány např. u *E. cuniculi*, konkrétně PTP4 a PTP5 (Han et al., 2017). Na základně srovnávání sekvencí v BLASTp byly nalezeny homology u *N. bombycis*, které bohužel nebyly předmětem žádné studie.

5.3 Interakce mezi SWP a PTP

Protein SWP5 byl kromě exospory zralých spor detekován i ve vystřelené polární trubici. Pomocí imunoprecipitace, hmotnostní spektrometrie a imunofluorescenční analýzy bylo potvrzeno, že interaguje s proteiny PTP2 a PTP3. Jak je zmíněno v kapitole 5.1.2, předpokládá se, že SWP5 zajišťuje vnímání vnějších

stimulů (Li et al., 2012). Je tedy možné, že se podílí na přichycení trubice ke stěně spory a po správném stimulu např. změni konformaci a dojde k uvolnění trubice od stěny, čímž se umožní extruze.

Předpokládána byla také interakce proteinů polární trubice s proteiny SWP7 a SWP9, jelikož proteiny byly imunolokalizovány nejen v cytoplasmě a ve stěně spory, ale i v polární trubici (Yang et al., 2015). V navazující studii (Yang et al., 2016) byla metodou dvouhybridního kvasinkového systému potvrzena interakce SWP9 s PTP1 a PTP2, zatímco SWP7 v polární trubici zřejmě interaguje pouze s SWP9. SWP9 přichytává smyčky nevystřelené polární trubice uvnitř spory ke stěně a po vystřelení je lokalizován hlavně v kotevním místě polární trubice. Blokování SWP9 vedlo ke snížení úspěšnosti infekce. Na obrázku č. 8 je zobrazena kolokalizace proteinů SWP9 a PTP1.



Obrázek č. 8: Kolokalizace proteinů *N. bombycis*: B1 – DAPI, B2 – NbPTP1, B3 – NbSWP9, B4 – Překryv (Yang et al., 2016).

EOB14572 je charakterizován jako endosporový protein. Detekován byl však také, stejně jako SWP9, na začátku a na konci polární trubice „vystřelených“ spor, což indikuje interakci s PTP a roli ve „vystřelení“ trubice (Wang et al., 2017). Konkrétní interakce zatím nebyla popsána.

6. Závěr

Nosema bombycis je původcem nemoci bourců morušových, zvané pebrina, a v této bakalářské práci je představena jako modelový organismus pro studium unikátního infekčního aparátu mikrosporidií, který obsahuje dutou polární trubici.

V práci je popsán životní cyklus mikrosporidií, který zahrnuje dvě stádia – vegetativní stádium a stádium spory. Klíčovou fází je přechod mezi těmito stádii, který je doprovázen formováním infekčního aparátu a vznikem odolné sporové stěny. Ani jedna z těchto struktur nemá přesně známé složení. Cílem práce bylo shrnout dosavadní poznatky o proteinovém složení polární trubice a stěny spory u *N. bombycis*. *N. bombycis* byla zvolena jako modelový organismus především pro snadnou kultivaci v laboratoři na larvách lehce manipulovatelného bource morušového anebo na jeho buněčných kulturách a její význam v tradiční produkci hedvábí.

Dosud byly u *N. bombycis* popsány 3 proteiny polární trubice. Jedná se o PTP1, PTP2 a PTP3, které jsou považovány za hlavní stavební podjednotky trubice. Analýzou sekvencí bylo také potvrzeno, že se u *N. bombycis* vyskytují homology proteinů *E. cuniculi*, PTP4 a PTP5, které ovšem vyžadují další výzkum.

Proteinů sporové stěny bylo zatím popsáno 11 a v práci je jim věnovaná velká pozornost, protože jsou pro infekci klíčové. Podílejí se na vnímání vnějších podmínek a signalizaci (SWP5). Zprostředkovávají adhezi k hostitelské buňce (SWP26, SWP7, SWP9, SWP16). Některé dokonce přímo interagují s proteiny polární trubice (SWP5, SWP9) a účastní se tak např. přichycení polární trubice ke stěně spory.

Věnovat se výzkumu složení infekčního aparátu je důležité pro objasnění mechanismu infekce mikrosporidií, zvláště pak skládání polární trubice, která nemá v biologické říši obdoby a mohla by být využita v biotechnologiích, např. jako nástroj pro cílený transport léčiv přímo do buněk.

7. Seznam zkratek

<i>N. bombycis</i>	<i>Nosema bombycis</i>
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
SWP	Spore Wall Protein; protein stěny spory
SWPs	Spore Wall Proteins; proteiny stěny spory
HSWP	Hypothetical Spore Wall Protein; hypotetický protein stěny spory
NbSWP	<i>Nosema bombycis</i> Spore Wall Protein; protein stěny spory <i>N. bombycis</i>
PTP	Polar Tube Protein; protein polární trubice
PTPs	Polar Tube Proteins; proteiny polární trubice
DCSCs	Deproteinated Chitin Spore Coats; deproteinované chitinové sporové obaly
HBM	Heparin Binding Motif; heparin vazebný motiv
<i>E. intestinalis</i>	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
<i>E. cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
<i>E. hellem</i>	<i>Encephalitozoon hellem</i>
GAG	glykosaminoglycans; glykosaminoglykany
pI	isoelectric point; izoelektrický bod
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
BmTLP	<i>Bombyx mori</i> Turtle-Like Protein
2-D	two dimensional; dvoudimenzionální
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis; dodecylsírany sodný – polyakrylamidová gelová elektroforéza
BmN	buněčná linie připravená z ovariální tkáně <i>B. mori</i>
BmE	buněčná linie připravená z embryonálních buněk <i>B. mori</i>
BLASTp	protein Basic Local Alignment Search Tool; nástroj na vyhledávání lokálních podobností v proteinových sekvencích

8. Citovaná literatura

- Bohne, W., Böttcher, K., & Groß, U. (2011). The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: Biogenesis and characteristics of the host cell–pathogen interface. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(5), 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.006> *
- Brown, M., Longano, A., Dendle, C., Polkinghorne, K. R., & Kanellis, J. (2018). Confirmed microsporidial graft infection in a HIV-negative renal transplant recipient: A case report and review of the literature. *Transplant Infectious Disease*, e12888. <https://doi.org/10.1111/tid.12888>
- Cai, S., Lu, X., Qiu, H., Li, M., & Feng, Z. (2011). Identification of a *Nosema bombycis* (Microsporidia) spore wall protein corresponding to spore phagocytosis. *Parasitology*, 138(9), 1102–1109. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000801>
- Cardin, A. D., & Weintraub, H. J. (1989). Molecular modeling of protein–glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 9(1), 21–32. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.9.1.21>
- Franzen, C. (2004). Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, 20(6), 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.04.009> *
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P. M., Cali, A., ... Weiss, L. M. (2017). The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathogens*, 13(4), e1006341. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006341>
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2), 1–17. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016> *

- Hayman, J. R., Southern, T. R., & Nash, T. E. (2005). Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infection and Immunity*, 73(2), 841–848.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.841-848.2005>
- Hirt, R. P., Logsdon, J. M., Healy, B., Dorey, M. W., Doolittle, W. F., & Embley, T. M. (1999). Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 580–585. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.580>
- Chen, J., Geng, L., Long, M., Li, T., Li, Z., Yang, D., ... Zhou, Z. (2013). Identification of a novel chitin-binding spore wall protein (NbSWP12) with a BAR-2 domain from *Nosema bombycis* (microsporidia). *Parasitology*, 140(11), 1394–1402.
<https://doi.org/10.1017/S0031182013000875>
- Ishihara, R. (1969). The life cycle of *Nosema bombycis* as revealed in tissue culture cells of *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(3), 316–320.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(69\)90157-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90157-8)
- Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 93–116.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854> *
- Keohane, E. M., & Weiss, L. M. (1998). Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitologica*, 45(2), 117–127. *
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J., & Heitman, J. (2008). Microsporidia Evolved from Ancestral Sexual Fungi. *Current Biology*, 18(21), 1675–1679. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.030>
- Li, Y., Tao, M., Ma, F., Pan, G., Zhou, Z., & Wu, Z. (2015). A monoclonal antibody that tracks endospore formation in the microsporidium *Nosema bombycis*. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121884>

- Li, Z., Pan, G., Li, T., Huang, W., Chen, J., Geng, L., ... Zhou, Z. (2012). SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic microsporidian *Nosema bombycis*. *Eukaryotic Cell*, 11(2), 229–237.
<https://doi.org/10.1128/EC.05127-11>
- Li, Y., Wu, Z., Pan, G., He, W., Zhang, R., Hu, J., & Zhou, Z. (2009). Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis*. *International Journal for Parasitology*, 39(4), 391–398.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.011>
- Liu, H., Chen, B., Hu, S., Liang, X., Lu, X., & Shao, Y. (2016). Quantitative Proteomic Analysis of Germination of *Nosema bombycis* Spores under Extremely Alkaline Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1459.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01459>
- Lom J., Vávra J. 1963: The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool.* 1: 81-92
- Pan, G., Xu, J., Li, T., Xia, Q., Liu, S.-L., Zhang, G., ... Zhou, Z. (2013). Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics*, 14, 186.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-186> *
- Pan, M.-H., Cai, X.-J., Liu, M., Lv, J., Tang, H., Tan, J., & Lu, C. (2010). Establishment and characterization of an ovarian cell line of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue and Cell*, 42(1), 42–46.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.07.002>
- Pan, M.-H., Xiao, S.-Q., Chen, M., Hong, X.-J., & Lu, C. (2007). Establishment and characterization of two embryonic cell lines of *Bombyx mori*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 43(2), 101–104.
<https://doi.org/10.1007/s11626-006-9009-x>

Reynolds, S. E. (2013). Immunity and Invasive Success. *Science*, 340(6134), 816–817. <https://doi.org/10.1126/science.1238998>

Takvorian, P. M., & Cali, A. (1996). Polar tube formation and nucleoside diphosphatase activity in the microsporidian, *Glugea stephani*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(5), 102S–103S. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb05025.x>

Undeen, A. H. (1990). A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *Journal of Theoretical Biology*, 142(2), 223–235. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(05\)80223-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80223-1)

Vávra, J., & Larsson, J. I. R. (1999). Structure of the Microsporidia. In *The Microsporidia and Microsporidiosis* (pp. 7–84). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555818227.ch2>

Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B. A., & Woese, C. R. (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, 326(6111), 411–414. <https://doi.org/10.1038/326411a0>

Wang, Y., Geng, H., Dang, X., Xiang, H., Li, T., Pan, G., & Zhou, Z. (2017). Comparative Analysis of the Proteins with Tandem Repeats from 8 Microsporidia and Characterization of a Novel Endospore Wall Protein Colocalizing with Polar Tube from *Nosema bombycis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(5), 707–715. <https://doi.org/10.1111/jeu.12412>

Wang, Y., Dang, X., Ma, Q., Liu, F., Pan, G., Li, T., & Zhou, Z. (2015). Characterization of a novel spore wall protein NbSWP16 with proline-rich tandem repeats from *Nosema bombycis* (microsporidia). *Parasitology*, 142(4), 534–542. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001565>

- Wang, J. Y., Chambon, C., Lu, C. De, Huang, K. W., Vivarès, C. P., & Texier, C. (2007). A proteomic-based approach for the characterization of some major structural proteins involved in host-parasite relationships from the silkworm parasite *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics*, 7(9), 1461–1472. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600825>
- Weidner, E., Byrd, W., Scarborough, A., Pleshinger, J., & Sibley, D. (1984). Microsporidian Spore Discharge and the Transfer of Polaroplast Organelle Membrane into Plasma Membrane. *The Journal of Protozoology*, 31(2), 195–198. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb02948.x>
- Weidner, E. (1972). Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde*, 40(3), 227–242. <https://doi.org/10.1007/BF00329623>
- Wittner, M.; Weiss, LM. The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press; Washington, DC: 1999. *
- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Zhou, Z., & Xiang, Z. (2009). SWP25, a novel protein associated with the *Nosema bombycis* endospore. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00375.x>
- Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Tan, X., Hu, J., Zhou, Z., & Xiang, Z. (2008). Proteomic analysis of spore wall proteins and identification of two spore wall proteins from *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics*, 8(12), 2447–2461. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700584>
- Xu, Y., & Weiss, L. M. (2005, August). The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *International Journal for Parasitology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.04.003> *

- Yang, D., Pan, L., Chen, Z., Du, H., Luo, B., Luo, J., & Pan, G. (2018). The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Experimental Parasitology*. Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.007> *
- Yang, D., Pan, L., Peng, P., Dang, X., Li, C., Li, T., ... Pana, G. (2016). Interaction between SWP9 and polar tube proteins of the microsporidian *Nosema bombycis* and function of SWP9 as a scaffolding protein contribute to polar tube tethering to the spore wall. *Infection and Immunity*, 85(3), 1–14.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00872-16>
- Yang, D., Pan, G., Dang, X., Shi, Y., Li, C., Peng, P., ... Zhou, Z. (2015). Interaction and assembly of two novel proteins in the spore wall of the microsporidian species *Nosema bombycis* and their roles in adherence to and infection of host cells. *Infection and Immunity*, 83(4), 1715–1731.
<https://doi.org/10.1128/IAI.03155-14>
- Yang, D., Dang, X., Tian, R., Long, M., Li, C., Li, T., ... Zhou, Z. (2014). Development of an approach to analyze the interaction between *Nosema bombycis* (microsporidia) deproteinated chitin spore coats and spore wall proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 115(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.004>
- Zhou, L., Li, H., Hao, F., Li, N., Liu, X., Wang, G., ... Tang, H. (2015). Developmental changes for the hemolymph metabolome of silkworm (*Bombyx mori* L.). *Journal of Proteome Research*, 14(5), 2331–2347.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00159>
- Zhu, F., Shen, Z., Hou, J., Zhang, J., Geng, T., Tang, X., ... Guo, X. (2013). Identification of a protein interacting with the spore wall protein SWP26 of *Nosema bombycis* in a cultured BmN cell line of silkworm. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.029>

* sekundární citace